

## ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor

著者	久原 真
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 2149, 1999.3.25 Joint authors: Shin'ichi Shoji, Hideyuki Okano and Masayuki Miura Offprint. Originally published in: Journal of neurochemistry, v. 69, no. 1, pp. 10-20, 1997 Includes supplementary treatise
発行年	1999
その他のタイトル	腫瘍壊死因子(TNF)によるオリゴデンドロサイト細胞死実行に関するICE/CED-3ファミリーについての研究
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/1356">http://hdl.handle.net/2241/1356</a>

氏 名 (本 籍)	ひさ 久 原	はら 真 (北 海 道)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)	
学 位 記 番 号	博 甲 第 2,149 号	
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学 位 論 文 題 目	ICE/CED-3 Family Executes Oligodendrocyte Apoptosis by Tumor Necrosis Factor (腫瘍壊死因子 (TNF) によるオリゴデンドロサイトアポトーシス実行に関与する ICE/CED-3 ファミリーについての研究)	
主 査	筑波大学教授	医学博士 三 輪 正 直
副 査	筑波大学教授	医学博士 中 内 啓 光
副 査	筑波大学教授	医学博士 岡 戸 信 夫
副 査	筑波大学講師	医学博士 山 本 三 幸

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

オリゴデンドロサイト (OLG) は中枢神経において、髄鞘形成に不可欠なグリア細胞である。中枢神経脱髄疾患である多発性硬化症 (MS) は免疫担当細胞の異常な反応により OLG が特異的に障害され細胞死 (アポトーシス) が起こり脱髄を生じることが知られている。MS では中枢内に浸潤した T 細胞, マクロファージ/ミクログリア系の細胞から産生される腫瘍壊死因子 (TNF), リンホトキシン (LT), インターフェロン  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) などのサイトカインが OLG を障害すると考えられている。一方細胞内のアポトーシス実行遺伝子として ICE/CED-3 ファミリー (現在の呼称はカスパーゼファミリーが一般的であり, 以上これに統一) が知られており現在までに 14 個の遺伝子が同定されている。本実験では主に初代培養系を用いて OLG にカスパーゼファミリーが存在していることを確認し, サイトカイン投与により細胞死が生じる際にカスパーゼファミリーが関与しているかを検討した。

### (方法)

1) まず OLG を用いて実験する前に, 使用する化合物が培養系で使用可能かどうかを確認するために, HeLa 細胞の一過性発現系を用いて観察した。実験を実施し, 機能解析を行った。カスパーゼ遺伝子として *ice* (*caspase-1*), *ich-1* (*caspase-2*), *ich-3* (*caspase-11*) の下流にコードする蛋白質の C 末端側に *lacZ* 遺伝子由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛋白質を連結させた融合蛋白質を発現させるプラスミドを作製し, 哺乳類細胞株の HeLa 細胞を用いてトランスフェクションによる一過性発現系にてこれらが発現させ, 48 時間後細胞を固定し X-Gal 染色にて染色された細胞の形態により細胞死阻害効果を観察した。次に培養液中に TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) とシクロヘキシミド (CHX) (10  $\mu$ g/ml) を投与し 48 時間後にトリパンブルー染色にて生存率を算出した。さらに強力な広範囲のカスパーゼファミリー阻害剤として知られている Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (40  $\mu$ g/ml) を同時に投与し効果を確認した。

2) 胎生 18 日前後の ICR マウス胎児の全納を摘出し, 細切した後 T-フラスコ中, 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含有した DMEM にて約一週間で飽和細胞密度の状態まで培養した。フラスコを震盪し遊離した OLG の全駆細胞の O-2A 細胞のみを回収し, 2% FBS 含有 DMEM 培地で培養し O-2A 細胞を OLG へと文化させた。

3) OLG から RNA を抽出し *caspase-1*, *-2*, *-3* の特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。次に HeLa

細胞の要領で培養液中に TNF- $\alpha$  (100ng/ml) を投与しアポトーシスを TUNEL 法で観察した。また TNF- $\alpha$  と caspase-1 様プロテアーゼに特異的なペプチド型阻害剤である Ac-YVAD-CHO (100  $\mu$ M), caspase-3 様プロテアーゼに特異的なペプチド型阻害剤である Ac-DEVD-CHO (100  $\mu$ M), p35 様の特異性を示す阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (40  $\mu$ g/ml) を同時に投与し72時間後に培養皿に付着している OLG の数を計量した。

(結果)

TNF/CHX を HeLa 細胞に投与するとカスパーゼ分子を活性化しアポトーシスが認められ、Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB がこれを抑制した。一方マウス胎児脳から取り出した OLG の全駆細胞を低血清状態で分化させた成熟 OLG に caspase-1, -3 が存在することを RT-PCR 法によって明らかにした。TNF- $\alpha$  を投与後36時間において TUNEL 法によりアポトーシスを認めた。この系に Ac-YVAD-CHO, Ac-DEVD-CHO, Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を TNF- $\alpha$  と共に投与したところ著明な抑制効果を観察した。しかしセリンプロテアーゼ阻害剤である TLCK, Leupeptin は抑制できなかった。これらの阻害剤の中では Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB が最も効果があり、次に Ac-YVAD-CHO, Ac-DEVD-CHO の順であった。

(考察)

OLG は TNF- $\alpha$  に対して感受性があり、カスパーゼファミリーを介してアポトーシスが誘導されることが示唆された。興味深いことにカスパーゼファミリーの中でも caspase-1 様プロテアーゼ阻害剤を用いた方が caspase-3 様プロテアーゼ阻害剤を用いた場合よりも細胞死抑制効果が強かった。現在のところ細胞死の最終的な実行は caspase-3 系の分子が司ると考えているが、OLG では TNF- $\alpha$  による細胞死において、caspase-1 様プロテアーゼが関与することが示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、初代培養系におけるオリゴデンドロサイト (OLG) がサイトカイン TNF- $\alpha$  に対して感受性を有し、アポトーシスが誘導されることを明らかにし、カスパーゼファミリーが関与している可能性が高いことを阻害剤を用いた実験で明らかにしたものである。本研究は、オリゴデンドロサイトの特異的障害によると考えられる多発性硬化症等の脱髄疾患の病態解明や治療法の開発などに応用できる可能性が示されたものとして価値がある。今後の課題は、(1) が脱髄が生じている生体においてオリゴデンドロサイトが実際にアポトーシスを生じていることの証明、(2) caspase の関与が脱髄疾患、殊にオリゴデンドロサイトに対してどの程度関与しているかの検討が必要である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。